

Zárójelentés

A HISS mechanizmus farmakológiai modulációja. ACE-inhibitor és NO-donor módosító termék innovációs fejlesztés 2-es típusú diabétesz mellitus kezelésére.

A pályázat címében megfogalmazottak szerint a támogatott kutató, olyan napjainkra igen jelentőssé vált, nagy populációt érintő betegségek, mint az inzulin rezisztencia, a 2-es típusú cukorbetegség és e megbetegedések szív- és érrendszeri szövődményeinek alapját képező biológiai mechanizmusok feltérképezését tűzte ki maga elé célként. Ennek megvalósításával a kedvezményezett számára lehetővé vált, hogy az alapkutatásból alkalmazott kutatássá fejleszthesse a munkáját, mely ezáltal nem csak tudományos szempontból vált mérhetővé az impakt faktorok révén, de az ipari hasznosíthatóságban rejlő lehetőségek révén gazdasági és társadalmi vonzatai is jelentősek.

A 90 évek során egy kanadai kutatócsoport ismerte fel, hogy az étkezést követően a szervezet inzulin érzékenysége fokozódik. A feltételezés szerint a táplálkozást követően a májat beidegző plexus hepaticus anterior paraszimpatikus (később Pórszász és mtsai szerint szenzoros rostjainak) aktiválódása révén a májból egy eddig ismeretlen hormonszerű anyag szabadul fel, mely a perifériás inzulin érzékeny szövetek inzulin iránti érzékenységét fokozza. Az ismeretlen hormonszerű anyagot hepatic insulin sensitizing substance-nak (HISS), míg ezen endogén inzulinérzékenyítő mechanizmust HISS mechanizmusnak nevezték el. Bár a mechanizmus aktivációjának háttérében álló anatómiai kérdésekben a téma kutatói között nem teljes az egyetértés, abban a kérdésben azonban nincs vita, miszerint a nitrogén monoxid (NO) központi szerepet játszik benne.

Ahhoz, hogy a szervezet endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusának farmakológiai háttérét a munkacsoportunk tanulmányozni tudja, első lépésként szükséges volt a megfelelő metodikai arzenál kiépítésére és elsajátítására. Az inzulin érzékenység meghatározására elfogadott módszer, a hiperinzuliémiás euglikémiás glükóz clamp módszer mellett sikeresen beállítottuk e módszer egyszerűsített formáját, a rapid inzulin sensitivity test –et. Az elért eredményeket később a *Journal of Biochemical & Biophysical Methods* –ban publikáció formájában is megjelentettük (Zsuga és mtsai 2004.).

A pályázati periódus során tovább folytattuk az endogén inzulin-érzékenyítő mechanizmus farmakológiai vizsgálatát. Ennek során azt vizsgáltuk, hogy a májhoz futó plexus hepaticus anterior (PHA) feltételezett paraszimpatikus innervációja milyen szerepet

játszik a prandiális státuszhoz kötött inzulin érzékenység fokozásban. Ennek során rapid insulin sensitivity test (RIST) segítségével egészséges hím Wistar patkányokon meghatároztuk az inzulin érzékenységet az étkezésben nem korlátozott és a 16 órán keresztül éheztetett csoportban egyaránt. Atropin intravénás adása azonnali, az inzulin hipoglikémizáló hatásának csökkenését eredményezi, ami az eddigi irodalmi adatokkal megegyezik. A paraszimpatikus innerváció jelentőségének további alátámasztása céljából olyan kísérleti felállást terveztünk, melyben a bal oldali nyaki vagus - mely tartalmazza a PHA-hoz futó összes rostot - elektromos (15 V, 5 Hz, 15 perc, 0,5 ms) ingerlésével vizsgáltuk az inzulin érzékenység változását RIST módszer segítségével. A kapott eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a nervus vagusban futó paraszimpatikus rostok nem játszanak szerepet a kiváltott post-prandiális inzulin érzékenység fokozódásban. A kapott eredményünk publikálásra került a Metabolism c. folyóiratban (Peitl és mtsai 2005).

A bevezetőben említésre került az NO szerepe az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmusban. Ezen megállapítás továbbgondolása vezetett annak a feltételezéséhez, hogy minden olyan farmakológiai beavatkozás, mely az NO szignál transzdukciós útba avatkozik be, alkalmas célpont lehet inzulinérzékenyítő fejlesztés céljából. Így került sor az orálisan alkalmazható nitrátok vizsgálatára. Azon megállapításunk, miszerint az orálisan alkalmazott nitrátok alacsonyabb dózisban inzulin szenzitizáló szerek, mint antiiszkémiás vegyületek, új indikációs területet jelenthet ezen, több mint egy évszázada használt szerek számára. Kísérleteinkben megvizsgáltuk a nitrátok inzulin szenzitizáló hatását a referencia szerként használt troglitazone (az inzulin szenzitizáló thiazolidindionok prototípusa) hatásával szemben, mely alapján kiderült, hogy az izoszorbid mononitrát inzulin szenzitizáló hatása a klasszikus inzulin-érzékenyítőkével összemérhető. Igen meglepő eredményeink alapján az elmúlt hat hónapban derült fény arra is, hogy a metformin kivételével valamennyi vizsgált inzulin szenzitizáló szer (troglitazone, nitrát) hatásmechanizmusában lényeges komponens a májat ellátó kapszaicin érzékeny szenzoros rostok szomatosztatinerg aktivációjához kötött endogén inzulin érzékenyítő HISS mechanizmus stimulálása. Ezt bizonyítja, hogy a szisztémás cysteamine kezeléssel létrehozott funkcionális szomatosztatin depléción, valamint a regionális kapszaicin deszenzibilizálás hasonló hatása alapján valószínű, hogy a HISS neurális szomatosztatin, ill. olyan anyag, melynek képződése szomatosztatin függő. Az eredményeink a *Journal of Cardiovascular Pharmacology*-ban jelent meg (Bajza és mtsai, 2004). A közleményben részletezett eredmények szerint a pályázati célkitűzések munkahipotézise számos ponton megerősítést nyert: minden szer, mely a plexus hepaticus anterior szenzoros rostpopulációjának stimulációját okozza, alkalmas lehet arra, hogy a 2-es típusú

cukorbetegség ill. inzulin rezisztencia szindróma farmakoterápiájára alkalmas gyógyszerfejlesztés kiindulási vegyülete legyen.

Mivel a felvetett hipotézisünket, miszerint az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus az NO - cGMP szignáltranszdukciós útvonalon keresztül aktiválható, sikeresen igazoltuk, megvizsgáltuk más, szintén az NO – cGMP utat befolyásoló gyógyszercsoport lehetséges inzulinérzékenyítő hatását. Így került sor az angiotensin convertáz (ACE) gátló vegyületek illetve a cGMP foszfodiészteráz (cGMP-PDE) gátló vegyületek vizsgálatára. Mindkét molekulakör esetében a cél annak a megállapítása volt, hogy vajon a vizsgált szerek (captopril ill. cicletanine) a szisztémás, vérnyomáscsökkentő hatásuk mellett rendelkeznek-e inzulinérzékenyítő hatással, valamint hogy a két hatás eléréséhez szükséges dózisok miként aránylanak egymáshoz. A kísérletekhez inzulin rezisztens állatmodelleket alkalmaztunk. Az alábbiakban előbb az ACE gátlóval végzett eredményeimet írom le részletesen, ezt követően röviden beszámolok a cGMP-PDE gátló cicletanine alkalmazásával elért eredményeimről. Ez utóbbi eredmények bemutatásával könnyebb dolgom van, hisz az eredmény a közelmúltban publikálásra került a *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* folyóiratban (Peitl és mtsai, 2006).

A captopril inzulinérzékenyítő hatását hím, obese Zucker patkányban vizsgáltuk. A kísérlet során 4 csoport került kialakításra. A kontroll csoport mellett referencia szerként a roziglitazon szerepelt (3 mg/kg p.o.), míg az ACE gátló captopril hatását vizsgáltuk vérnyomáscsökkentő dózisban ill. ennél alacsonyabb dózis mellett. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a captopril inzulinérzékenyítő hatása csak a vérnyomás csökkentő dózistartományban jelentkezik és az inzulinérzékenyítő hatás mértéke elmarad attól, ami a referencia szerként használt roziglitazon kezelés esetében tapasztaltunk. Az eredmények részletesen bemutatásra kerültek a pályázati periódus 2. évét lezáró részjelentésben, jelenleg publikálásra készítjük elő az anyagot.

A cGMP-PDE gátló cicletanine inzulinérzékenyítő hatását inzulin rezisztens fehér nyulakban vizsgáltuk. Ennek során előbb a nyulakat 8 héten át tartó 1,5% koleszterin-dús táppal etettük, mely elismert állatkísérletes módszer az alimentáris hiperkoleszterinémia és inzulin rezisztencia kialakítására. Az eredményeink elsőként mutatták meg, hogy a cicletanine inzulinérzékenyítő hatása alacsonyabb dózisban jelentkezik, mint ami az NO-cGMP útvonal aktivációjához szükséges a vaszkuláris szövetekben. Vagyis a cicletanine inzulinérzékenyítő hatása a vérnyomáscsökkentő dózisonál alacsonyabb dózisban megvan. A cicletanine inzulin rezisztenciában megfigyelhető hatásának jelentőségét és a benne rejlő lehetőségeket jól mutatja, hogy a publikáció után megkeresett az amerikai Navitas Pharma Inc

(www.navitas.com) ügyvezető igazgatója, akivel együttműködési szándékunkat fejeztük ki, az időközben a cicletanine és rokon vegyületeinek hasznosítására létrejött egyetemi spin-off vállalkozáson (Sensocrine Phrama Kft.; www.sensocrinepharma.com) keresztül.

Az inzulin-érzékenyítő mechanizmusok farmakológiai vizsgálata során felfigyeltünk e hatás kihasználásának egy másik lehetőségére is. Ismert ugyanis, hogy az inzulin, mint növekedési faktor, szerepet játszik a haemopoetikus őssejtek kialakulásának korai differenciálódásában. A malignus betegségek a modern társadalmak halálozási listáján az előkelő 2. helyet foglalják el. A citosztatikus- és sugárterápia esetében dózist limitáló toxicitásként jelentkező csontvelő elégtelenség gyakran vezet a beteg halálához. Azt vizsgáltuk, vajon a korai növekedési faktorként viselkedő inzulin hatását helyettesíthetjük-e inzulin-érzékenyítő anyagokkal, befolyásolhatjuk-e a roziglitazonnal a csontvelő hemopoezisést. A csontvelő károsodást 5-fluorouracil (5-FU) egyszeri subletális dóziséval váltottuk ki egerekben. Mértékét a femorális csontvelő cellularitásának, és a speciális lágy-gél tenyészetekben meghatározható granulocyta-macrophag utánpótlásért felelős (GM-CFU) progenitorok kolóniaszámának valamint a femur progenitor sejttartalmának csökkenése mutatta. 5-FU citosztatikumot alkalmazva a granulocyta-macrophag utánpótlásért felelős csontvelői progenitor sejtek (GM-CFU) szignifikánsan kisebb mértékben károsodtak, ha az egereket roziglitazonnal előkezeltük. A roziglitazon inzulin-érzékenyítő hatását hasonló dózistartományban mértük egereinkben hyperinzulinémiás euglikémiás glükóz clamp technikával. A továbbiakban azt vizsgáltuk, képes-e a roziglitazon előkezelés nyújtotta védő hatás a csontvelő citosztatikum okozta károsodás utáni regenerációját felgyorsítani. A 100 mg/kg 5-FU dózis kifejezett károsodást okoz, mely után lassú a regeneráció. Azonban a roziglitazonnal előkezelt állatokban a CFU-GM kolónia szám dóziszfüggően 1, ill. 2 nappal korábban éri el a kontroll értéket. A progenitor sejt pool feltöltődése szintén gyorsabb, dóziszfüggően a 6. ill. az 5. napra megtörténik, míg a vehiculummal előkezelt állatokban a 6. napon még mindig csak a kontroll érték 40 %-a. A neutropénia nem olyan súlyos és az abszolút neutrophil szám szignifikánsan magasabb. A csontvelő cellularitása a 10. napra normalizálódik a roziglitazonnal előkezelt állatokban, mely 60% a csak 5-FU-val kezeltékben. A roziglitazon nem befolyásolta az inzulin vérszintjét az állatokban, amit RIA módszerrel mértünk. Az inzulin szenzitizáló anyagok alkalmazásával a myeloprotektív hatást, a hyperinzulinémia anyagcserére gyakorolt káros hatásai nélkül sikerült elérni. A kapott eredmény az *European Journal of Pharmacology* c. folyóiratnál publikálásra került (Djazayeri és mtsai, 2005).

A kutatási periódus a célkitűzéseknek megfelelően elkészült a rezisztin kimutatására alkalmas radioimmunoassay (RIA) módszer, melyben közreműködött a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézete Penke Botond akadémikus vezetésével az egyes peptid fragmentumok megsztintetizálásával, valamint a Pécsi Tudomány Egyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézete Németh József (aki azóta már a mi intézetünket erősíti) vezetésével a ¹²⁵I izotóppal jelölt, HPLC-vel tisztított RIA "tracer" előállításával valamint a módszer teljes kifejlesztésével. A továbbiakban a kifejlesztett módszert klinikai felhasználásra kívánjuk alkalmazni, egyrészt hatásmechanizmus kutatásra, másrészt a DEOEC I. sz. Belklinikájának anyagcsere ambulanciái gondozásában álló inzulin rezisztenciában, valamint II. típusú cukorbetegségben szenvedő betegek vizsgálatára. A várható eredmények alapján a 2-es típusú diabéteszes betegek az eddigieknél jóval racionalizáltabb terápiája valósítható meg. A módszert szabadalmi oltalom védi. Bejelentés ügyiratszám: P 04 01175, bejelentés napja: 2004. 06. 11.

A pályázati célkitűzésekben nem szerepelt, de az endogén inzulin érzékenyítő mechanizmus pathomechanizmusának tanulmányozásával összefüggésben részt vettem más munkacsoportok munkájában is, mely eredmények részletezésétől a rendelkezésre álló hely szűke miatt eltekintek, csak röviden az alábbiakban felsorolom a megjelent publikációk listáját:

- Horvath,P, Szilvassy,J, Nemeth,J, Peitl,B, Szilasi,M, Szilvassy,Z: Decreased sensory neuropeptide release in isolated bronchi of rats with cisplatin-induced neuropathy. Eur.J.Pharmacol. 507:247-252, 2005
- Horvath,P, Szilvassy,Z, Peitl,B, Szilvassy,J, Helyes,Z, Szolcsanyi,J, Nemeth,J: Changes in tracheo-bronchial sensory neuropeptide receptor gene expression pattern in rats with cisplatin-induced sensory neuropathy. Neuropeptides 40:77-83, 2006
- Szilvassy,J, Sziklai,I, Sari,R, Nemeth,J, Peitl,B, Porszasz,R, Lonovics,J, Szilvassy,Z: Neurogenic insulin resistance in guinea-pigs with cisplatin-induced neuropathy. Eur.J.Pharmacol. 531:217-225, 2006.

Összefoglalva a pályázati periódus eredményeit megállapítható, hogy a támogatott a pályázati célkitűzések megvalósítása során jelentős eredményeket ért el az endogén inzulinérzékenyítő mechanizmus farmakológiai vizsgálata során. Bár a pályázati kiírásnak nem volt feltétele, hogy az alapkutatáson túl, az eredmények gyakorlati alkalmazását is elvárja, mégis úgy vélem, hogy az egyik legnagyobb erénye a támogatási periódus alatt

elvégzett munkának, hogy a kapott támogatást sikerült olyan célra felhasználni, mely során szabadalommal védhető termék előállításának a feltételeit sikerült megteremteni. Ez pedig lehetővé teszi, hogy a megkezdett projekt megvalósítása a továbbiakban ne az alapkutatás terhére valósuljon meg, így sikeresen összekapcsolva az alapkutatást az alkalmazott kutatással.